FACULTÉ DE MEDECINE DE PARIS

ANNEE 1962

N° 322

THESE

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

FOISIL, CLAUDE

Externe des Hôpitaux de PARIS

Né le 22 Novembre 1931 à PARIS

Présentée et soutenue publiquement le

HYDROXOCOBALAMINE

VITAMINE B 12 RETARD NATURELLE

PRESIDENT : MONSIEUR LE PROFESSEUR M. CONTE

Roger VEZIN - 48, rue de la Santé - PARIS

FACULTÉ DE MEDECINE DE PARIS

ANNEE 1962 Nº

THESE

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

FOISIL, CLAUDE

Externe des Hôpitaux de PARIS

Né le 22 Novembre 1931 à PARIS

Présentée et soutenue publiquement le

HYDROXOCOBALAMINE

VITAMINE B 12 RETARD NATURELLE

PRESIDENT : MONSIEUR LE PROFESSEUR M. CONTE

Roger VEZIN - 48, rue de la Santé - PARIS

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

A notre Maître et Président de Thèse,

Monsieur le Professeur M. C O N T E

Professeur de Thérapeutique

à la Faculté de Médecine de PARIS

Médecin des Hôpitaux de PARIS

Qui nous a fait le grand honneur

d'accepter la présidence de cette thèse

HOMMAGES RESPECTUEUX.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538118_0032

A Monsieur le Docteur SUREAU

Médecin de l'Hôpital de l'Institut Pasteur à PARIS

Docteur ès Sciences

Par son bienveillance et ses conseils,

Il nous a aidé dans l'élaboration de ce travail,

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression

de notre reconnaissance.

A Monsieur le Docteur PY,

Avec toute notre amitié.

A NOS MAITRES D'EXTERNAT :

Monsieur le Docteur ABERLIN,

Monsieur le Docteur LAYANI,

Monsieur le Docteur MOUSSOIR,

Monsieur le Docteur MARQUEZY,

Monsieur le Docteur BACH,

Monsieur le Docteur DI MATTEO,

Monsieur le Docteur SEGUY.

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. AUBIN (A.), BENARD (H.), BROCQ (P.), BULLIARD (H.), CADENAT (F.), CHABROL (E.), CHAMPY (C.), CHEVALLIER (P.), DEBRE (R.), DONZELOT (E.), GASTINEL (P.), GUILLAIN (G.), HALPHEN (E.), HARVIER (P.), HAZARD (R.), HEUYER (G.), LANTUEJOUL (P.), LAROCHE (G.), LAUBRY (C.), LEVY SOLAL (E.), LIAN (C.), LOEPER (M.), MARION (G.), MATHIEU (P.), MOCQUOT (P.), MONDOR (H.), MONOD (R.), MOREAU (R.), OLIVIER (E.), PASTEUR VALLERY RADOT, PETIT-DUTAILLIS, RICHET (C.), STROHL (A.), TANON(L.).

DOYEN — L. B I N E T
Membre de l'Institut

ASSESSEUR — Jean VERNE

I.- P R O F E S S E U R S

	MM.
Anatomie	CORDIER G.
" (Prof. à titre personnel)	DELMAS (A.)
Anatomie Pathologique	DELARUE (J.)
Anesthésiologie	BAUMANN (J.)
Bactériologie	FASQUELLE (R.)
Biochimie médicale	JAYLE (M.P.)
" " (Prof. à titre personnel)	SCHAPIRA (G.)
Biologie appliquée à l'Ed. Physique et aux Sports	CHAILLEY-BERT (P.)
Biologie médicale	FAUVERT (R.)
" " (Prof. à titre personnel)	BOURLIERE (F.)
Cancérologie médicale et sociale	BERNARD (J.)
Clinique carcinologique chirurgicale (Institut G.ROUSSY)	REDON (H.)
Clinique cardiologique (Broussais)	MOUQUIN (M.)
(Beaujon)	SICARD (A.)
(Cochin)	QUENU (J.)
Cliniques chirurgicales (Hôtel-Dieu)	PATEL (J.)
(Saint-Antoine	GOSSET (J.)
(Salpêtrière	MOULONGUET (P.)
Clinique de chirurgie infantile et orthopédique (Enfants Malades)	FEVRE (M.)
Clinique chirurgicale orthopédique et réparatrice (Cochin)	MERLE d'AUBIGNE

Clinique de Chirurgie cardio-vasculaire (Broussais)	MM.	GAUDART d'ALLAINES
Clinique de Chirurgie pleuro-pulmonaire (Laënnec)		MATHEY (J.)
Clinique endocrinologique (Pitié)		DECOURT (J.)
Clinique de génétique médicale (Enf. Malades)		LAMY (M.)
Clinique gynécologique (Broca)		FUNCK BRENTANO (P.)
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques (Saint Louis)		DEGOS (R.)
Clinique des maladies des enfants		CATHALA (J.)
Clinique des maladies infectieuses (Cl.Bernard)		MOLLARET (P.)
Clinique des maladies mentales et de l'encéphale (Sainte Anne)		DELAY (J.)
Clinique des maladies métaboliques (Necker)		HAMBURGER (J.)
Clinique des maladies du sang (Broussais)		MARCHAL (G.)
Clinique des maladies du système nerveux (Salpêtrière)		ALAJOUANINE (T.)
Cliniques médicales (Boucicaut		LENEGRE (J.)
(Broussais		SOULIE (P.)
(Cochin		JUSTIN BESANCON
(Hôtel-Dieu		BARIETY (M.)
(Pitié		DREYFUS (G.)
(Saint Antoine		KOURILSKY (R.)
Clinique médicale d'hydrologie thérapeutique et climatologie (Richet)		DEBRAY (C.)
Clinique médicale propédeutique (Broussais)		de GENNES (L.)
Clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies de la nutrition (Hôtel Dieu)		DEROT (M.)
Clinique de neuro-chirurgie (Pitié)		DAVID (M.)
Cliniques obstétricales (Baudelocque)		LACOMME (M.)
(Foch (Suresnes)		MERGER (R.)
Clinique obstétricale et gynécologique (Port-Royal)		VARANGOT (J.)
Clinique ophtalmologique (Hôtel-Dieu)		RENARD (G.)
Clinique oto-rhino-laryngologique (Lariboisière)		AUBRY (M.)
Clinique de pédiatrie sociale (Enf.Malades)		MARIE (J.)
Clinique de pneumo-phtisiologie (Laënnec)		BERNARD (E.)
Clinique psychiatrique infantile (Salpêtrière)		MICHAUX (L.)
Clinique de rhumatologie médicale et sociale (Cochin)		COSTE (F.)
Clinique stomatologique (Pitié)		DECHAUME (M.)
Clinique thérapeutique chirurgicale (Vaugirard)		ROUX (M.)
Clinique thérapeutique médicale (St-Antoine)		LEMAIRE (A.)
Clinique urologique (Cochin)		FEY (B.)
Embryologie		GIROUD (A.)

Histoire de la Médecine et de la Chirurgie (Lariboisière)	MM. SEZE (S. de)
Histologie	VERNE (J.)
Hygiène et Clinique de la première enfance (Trousseau)	TURPIN (R.)
Hygiène et Médecine préventive	JOANNON (P.)
Hygiène et Médecine préventive (Prof.à titre pers.)	DEPARIS (M.)
Médecine du travail	DESOILLE (M.)
Médecine légale	PIEDELIEVRE (R.)
Parasitologie	GALLIARD (H.)
Pathologie chirurgicale	COUVELAIRE (R.)
Pathologie exotique	LAVIER (G.)
Pathologie expérimentale et comparée	MERKLEN (F.P.)
Pathologie médicale	MILLIEZ (P.)
Pathologie et thérapeutique générales	GARCIN (R.)
Pharmacologie	CHEYMOL (J.)
" (Prof. à titre personnel)	LEVY (Melle J.)
Physiologie	BINET (L.)
" (Prof. à titre personnel)	BARGETON (D.)
Physique médicale	DOGNON (A.)
" " (Prof. à titre personnel	DJOURNO (A.)
Radiologie médicale	DESGREZ (M.)
Technique chirurgicale et Chirurgie expérimentale	LEGER (L.)
Thérapeutique	BROUET (G.)

II.- PROFESSEURS SANS CHAIRE, PROFESSEURS AGREGES

Anatomie	DABROL (C.)
	COUINAUD (C.)
	OLIVIER (G.)
Anatomie Pathologique	Melle GAUTHIER-VILLARD(P.)
	Pr. s. ch.
	MM. BUSSER
	GOUYGOU (Ch.)
	ORCEL (L.)
	PAILLAS (J.)
Anesthésiologie	VOURC'H
Bactériologie	NEVOT (A.)Pr. s.ch.
	BARBIER (P.)
	CHRISTOL (D.)
Biochimie médicale	DESGREZ (P.)
	(Pr. s. ch.)
	POLONOVSKI (J.)
	M. conf.

	MM.
Biologie appliquée à l'Ed.Physique et aux Sports	PLAS (F.)
Carcinologie	DENOIX (P.)
	MATHE (G.)
Dermato-Syphiligraphie	DUPERRAT (B.)
Electro-Radiologie	LEDOUX-LEBARD (G
Embryologie	TUCHMANN-DUPLESSIS (H.)
	Pr. s. ch.
Hématologie	BILSKI-PASQUIER
	DAUSSET (J.)
Histologie	COUJARD (R.)
	Pr. s. ch.
	MAROIS (M.)
	RACADOT (J.)
Hydrologie	CORNET (A.)
Hygiène	BOYER (J.)
	Pr. s. ch.
	Mme CORRE-HURST(L.)
Maladies infectieuses	MM. BASTIN (R.)
	DUPONT (V.)
Médecine Légale	DEROBERT (L.)
	Pr. s. ch.)
	HADENGUE (A.)
	FOURNIER (E.)
	GUENIOT (M.)
Médecine du Travail	ALBAHARY (C.)
Neurologie	HERMITTE (F.)
Obstétrique	GRANJON (A.)
	HERVET (E.)
	LE [illegible]RIER (G.)
	MORIN (P.)
	MUSSET (R.)
	ROBEY (M.)
	TROYER-ROZAT (J.)
Ophtalmologie	BREGEAT (P.)
	SARAUX (H.)
Orthopédie	JUDET (R.)
	RAMADIER (J.)
Oto-rhino-laryngologie	DEBAIN (J.)
Parasitologie	BRUMPT (L.C.)
	Pr. s. ch.
	CHABAUD (A.)
Pathologie Chirurgicale	BARCAT (J.)
	BINET (J.P.)
	COUCHOIX (J.)
	CHATELIN(C.L.)

Pathologie Chirurgicale	MM. DUBOST (Ch.)
	DUBOST (Cl.)
	FAUREL (J.)
	FLABEAU (F.)
	GERMAIN (A.)
	LAURENCE (G.) agr. per.
	LORTAT-JACOB (J.L.)
	LOYGUE (J.)
	MERCADIER
	PERROTIN (J.)
	ROBERT (H.)
	THOMERET (G.)
Pathologie exotique	SCHNEIDER (J.)
Pathologie expérimentale	CROSNIER (J.)
	HARTMANN (L.)
	LOEPER (J.)
	MAURICE (J.)
	RICHET (G.)
Pathologie médicale	AUSSANNAIRE (M.)
	BOUR (H.)
	BOUVIER (J.)
	BRICAIRE (H.)
	BRISSAUD (H.)
	BROCARD (H.)
	BUGE (A.)
	CASTAIGNE (P.) M.Conf.
	CATINAT (J.)
	CONTAMIN (F.)
	COURY (C.)
	FREZAL (J.)
	HOUSSET (E.)
	LAROCHE (R.)
	LESOBRE (R.)
	MACREZ (C.)
	NICK (J.)
	PEQUIGNOT (H.) M.Conf.
	ROYER (P.)
	WOLFROMM (R.)
Pédiatrie - Puériculture	JOSEPH (R.)
	MANDE (R.)
	MOZZICONACCI (C.)
	ROSSIER (A.)
Pharmacologie	BOISSIER (J.)
	LECHAT (P.)

Physiologie	MM. PARROT (J.)Pr.s. ch.
	DEJOURS (P.)
Physique médicale	GOUJEROT (L.)M.Conf.
	Pr. s. ch.
	KELLERSHOHN
Pneumo-Phtisiologie	KREIS (S.)
Psychiatrie	PICHOT (P.)
Psychiatrie infantile	DUCHE (D.)
Rhumatologie	DELBARRE (F.)
Stomatologie	CERNEA (P.)
	Mme A.CHAPUT,M.Conf.Agr.
	GRELLET (M.)
Thérapeutique	MM. CHASSAGNE (P.)
	LAMOTTE (M.)
Urologie	QUENU (L.)

III.- PROFESSEURS SANS CHAIRE ET AGREGES CHARGES DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE (à titre permanent)

Anatomie	MM. DEBEYRE
Clinique Chirurgicale	ABOULKER (P.)
	AMELINE (A.)
	(Pr.s. ch.)
	HUGUIER (J.)
	OLIVIER (C.)
	PADOVANI (P.)
	POILLEUX (F.)
	ROUX (M.)
	VERNE (J.M.)
Clinique médicale	BOUDIN (G.)
	CONTE (M.)
	DOMART (A.)
	PERRAULT (M.)
	RAMBERT (P.)
	THIEFFRY (S.)
	TURIAF (J.)
Clinique obstétricale	GRASSET (J.)
	LEPAGE (F.)
	MAYER (M.)
	RAVINA (J.)
Clinique ophtalmologique	DESVIGNES (P.)

Clinique ophtalmologique	MM. OFFRET (G.)
Clinique oto-rhino-laryngologique	MADURO (R.)
Clinique pédiatrique et puériculture	LAPLANE (R.)
Clinique psychiatrique	BARUK (H.)
Clinique urologique	KUSS (R.)
Médecine légale	GAULTIER

IV.- PROFESSEURS DETACHES DANS LES UNIVERSITES ETRANGERES

Bactériologie	MM. HAUDUROY ((P.) Pr. s. ch.
Biochimie médicale	ETTORI (J.) Pr. à t. pers.
Pathologie chirurgicale	RUDLER (J.) Pr. s. ch.

Secrétaire Général de la Faculté M. LENA (J.)

Secrétaires : Mme BEURLAND (H.), Melle CHAINTREUIL (G.) Melle HURE (A.)

Conservateur en Chef	Monsieur le Docteur HAHN (A.)
Conservateurs	Melles DUMAITRE (P.), GOICHON (A.M.)
Bibliothécaires	Mmes CONTET (J.), FORGET (F.)
	Melles LAURENT (H.), LE NOIR (G.), QUIEVREUX (E.)

Par délibération en date du 9 Décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

INTRODUCTION

L'application thérapeutique de la vitamine B_{12} ou cyanocobalamine, découverte en 1948, a donné des résultats spectaculaires dans le traitement des états carentiels et très vite on a assisté à l'extension de ses indications thérapeutiques.

Cependant, en raison de son passage éphémère dans le sang, de son élimination urinaire rapide, une vitamine B_{12} Retard était souhaitable, qui permettrait d'espacer les injections, de diminuer les doses, d'espérer de meilleurs résultats.

L'association à la vitamine B_{12} d'un véhicule retard a représenté un acheminement intéressant vers la formule d'une vitamine B_{12} retard idéale, qui semble être atteinte par l'hydroxocobalamine : forme naturelle retard de la cyanocobalamine, elle assure une rétention organique plus importante, des taux sanguins plus élevés, une fixation hépatique supérieure, une excrétion urinaire plus lente.

Il nous a paru logique dans ce travail sur l'hydroxocobalamine :

- d'envisager dans une première partie :
  - un rappel des caractéristiques de la cyonocobalamine, ainsi que son rôle essentiel dans l'organisme et son absorption intestinale.
- dans une seconde partie :
  - nous citerons rapidement la B_{12} retard par addition d'un véhicule retard, responsable d'une amélioration des

concentrations sanguines, mais étape transitoire avant la découverte de l'hydroxocobalamine dont l'étude chimique et pharmacologique constituera :

- la troisième partie de notre étude .

- Dans une quatrième partie :

  . nous étudierons l'effet retard de l'hydroxocobalamine en faisant appel aux différents travaux étrangers et français.

- Dans un dernier chapître :

  . sans insister sur les indications thérapeutiques de la vitamine B_{12} retard, nous parlerons d'une part de son action hématologique et d'autre part de son rôle dans le traitement des neuropathies diabétiques.

Pourons-nous conclure à la supériorité de l'hydroxocobalamine sur le cyanocobalamine et sur les premières B_{12} retard ?

— PREMIERE PARTIE —

- I -

CYANOCOBALAMINE : VITAMINE B12

HISTORIQUE

En 1947, Mary SHORB signalait l'existence dans le foie d'un facteur de croissance indispensable au développement des cultures de Lactobacillus Lactis Dorner (L.L.D.) et proposait leur utilisation comme test de titrage bactériologique du facteur antipernicieux du foie.

En 1948, deux groupes de chercheurs, l'un aux U.S.A., l'autre en Grande-Bretagne, de façon totalement indépendante et par des méthodes différentes , réussirent à extraire du foie une substance cristalline, de couleur rouge, possédant les propriétés des extraits antipernicieux les plus actifs : la découverte de la vitamine B_{12} ou cyanocobalamine allait représenter une étape décisive dans l'histoire des anémies.

SOURCES

La vitamine B_{12} se trouve répandue dans les milieux les plus divers :

- le foie en renferme 1 mg./kg.
- le lait, les oeufs 0,1 à 0,2 mg./kg.
- le rein, le muscle, la chair de poisson.

Sa présence a été signalée dans les bouillons de culture de plusieurs microorganismes tels les streptomyces griseus, aureofaciens, le lactobacillus Arabinosus.

Dans la nature, c'est aux bactéries et aux actynomycètes du sol que l'on doit de trouver la vitamine dans la terre et le règne végétal ; sa présence dans les selles et dans l'organisme des animaux et de l'homme est fonction de l'activité de la flore gastro-intestinale.

D'abord extraite du foie de boeuf avec un rendement très faible (20 mg. à partir d'une tonne de foie frais) , la production industrielle de la vitamine B_{12} était compromise, jusqu'au jour où la découverte du pouvoir de synthèse, que possèdent les micro-organismes, a ouvert la voie à des procédés plus pratiques, en particulier quand le streptomyces griseus s'est montré une source excellente en vitamine B_{12} .

- PREPARATION

La préparation industrielle est pratiquée par extraction de bouillons de culture de S. griseus et de S. clivaceus. Elle s'effectue à partir du mycélium ou de son filtrat de culture selon le micro-orgahisme, par fixation du principe actif sur du charbon activé ou sur des terres absorbantes, en milieu acide. La vitamine B_{12} brute, éluée par l'acétone hydratée, est purifiée par des partages successifs entre des solvants organiques sélectifs, puis par des chromatographies sur alumine permettant de séparer d'autres pigments présants dans les extraits initiaux.

T I T R A G E

Toute opération d'extraction suppose l'utilisation aux divers stades opératoires d'une méthode de titrage assez précise. Depuis la méthode initiale, proposée par Mary SHORB, d'autres, nombreuses, furent tentées mais le dosage exact de vitamine B_{12} dans les extraits de foie et dans les préparations opothérapiques complexes est resté de réalisation difficile.

- METHODES MICROBIOLOGIQUES

SNELL, en étudiant les besoins nutritifs des lactobacilli, montra que ces micro-organismes pouvaient constituer des tests pour la plupart des vitamines du groupe B et de nombreux acides aminés. En opérant dans certaines limites de concentration, la croissance du germe choisi est fonction du milieu en vitamine B_{12} .

- Emploi des Lactobacilli :

Le titrage est effectué en tube, ou par la mesure opacimétrique de la croissance microbienne, ou par la mesure acidimétrique de l'acide lactique formé, ou sur plaque de gélose. Méthode des cupes en gélose analogue à celle utilisée en antibiothérapie; Une zone de croissance microbienne se forme autour du godet contenant la solution dont le diamètre varie en fonction de la concentration en B_{12} de l'essai. Enfin, une autre méthode, dite bioautographique permet de localiser sur un chromatogramme l'activité vitaminique B12 par développement sur plaque de gélose ensemencée avec L.L.D.

Parmi les facteurs responsables de la croissance microbienne, certains sont dûs à la nature même du micro-organisme, d'autres à la composition du milieu, à ses caractéristiques physio-chimiques.

En 1947, Mary SHORB proposa l'emploi du test avec Lactobacillus Lactis Dorner pour titrage microbiologique et isolement du facteur antipernicieux. En fait, cette méthode a été abandonnée au profit du Lactobacillus Leichmanii, qui présente des caractères biologiques plus stables et plus indépendants du milieu.

- Emploi de E. Coli :

Méthode fondée sur un mutant d'E. Coli, obtenu par irradiation U.V., sensible uniquement à la vitamine B_{12} et à la méthionine.

- Emploi d'Euglina Gracilis, flagellé de la famille des algues.

Test quasi spécifique de la vitamine B_{12} additionnée de thiamine.

Ces méthodes microbiologiques donnent entière satisfaction avec les produits cristallisés ou purifiés, mais sont souvent insuffisantes avec des milieux complexes. Grâce à la chromatographie sur papier, on peut isoler les différentes formes de vitamine B_{12} des autres facteurs de croissance bactérienne ; après obtention des chromatogrammes, deux techniques sont utilisées :

- soit étaler les bandes de papier sur milieu gélosé, privé de vitamine B_{12} et ensemencé en ferments lactiques. Après 24 heures d'incubation à 37°, on peut par transparence suivre et photographier l'accroissement des cultures autour des taches de B_{12} et des autres facteurs de croissance, séparées sur le papier ;

- soit découper les taches, éluer sélectivement les produits ainsi préparés et doser la vitamine B_{12} dans les éluats microbiologiquement.

Ces "autobiographies" caractéristiques ont montré que dans les extraits de foie et les jus de fermentation des streptomyces, l'activité bactériologique était due à la vitamine B_{12} , surtout sous forme de bitamine $B_{12\ b}$.

- METHODE BIOLOGIQUE

On utilise l'action de la vitamine B_{12} sur la croissance de l'animal jeune (rat, poussin). En effet, chez l'animal jeune, soumis à un régime de protéines végétales, la vitamine B_{12} confère à celles-ci le pouvoir d'assurer la croissance dans les mêmes conditions qu'avec un régime constitué par des protéines animales (animal protein factor).

- METHODE PHYSIQUE

Dosage spectro-photométrique, fondé sur le spectre d'absorption typique à plusieurs bandes de la vitamine B_{12} (278 - 360 - 546 mμ) dont la mesure permet le titrage.

- METHODE CHIMIQUE

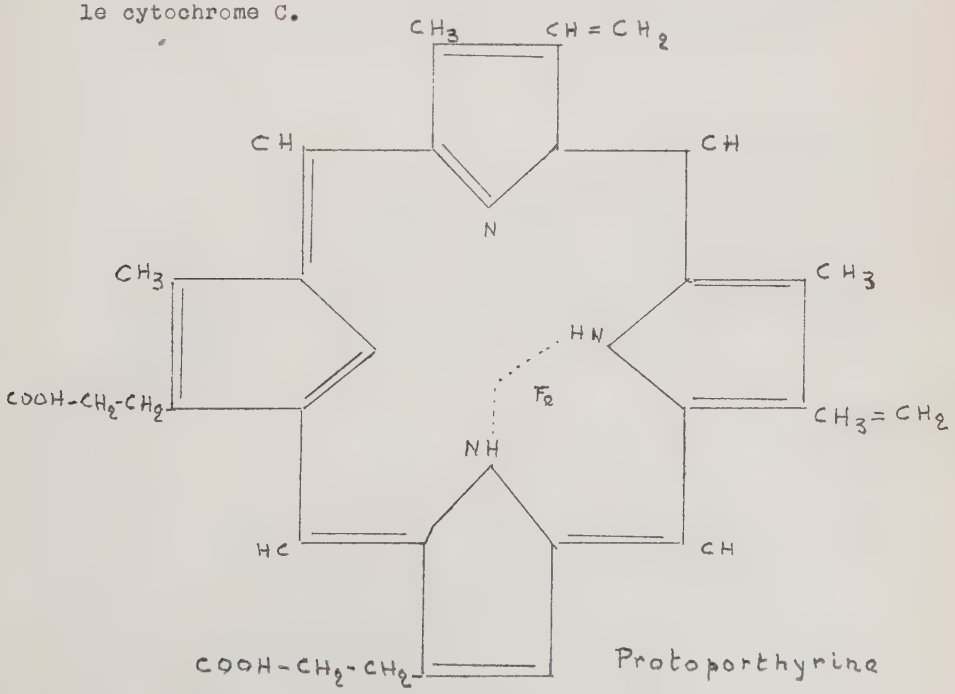
On peut, par colorimétrie , apprécier spécifiquement deux produits de décomposition : le 5,6 diméthylbenzimidazol et l'acide cyanhydrique , lié au cobalt de la vitamine B_{12} .

C H I M I E

La vitamine B_{12} ou cyanocobalamine, thermostable, se présente sous forme d'aiguilles rouges cristallines et renferme dans sa molécule :

- un noyau central complexe tétrapyrrolique polysubstitué entourant un atome de cobalt ;
- un groupement cyanure, fortement lié au cobalt ;
- un groupement du type nucléotide, lié au cobalt et rattaché au noyau central par un reste amino-propanol.

Elle présente ainsi une certaine parenté, dans sa structure, avec les porphyrines, par exemple avec l'hémoglobine, le cytochrome C.



Protoporphyrine

Il existe d'autres formes de vitamine B_{12} , voisines les unes des autres par leur structure chimique, plus différentes par leurs effets physiologiques ou leur spectre d'absorption. La plus connue est la vitamine $B_{12\ a}$.

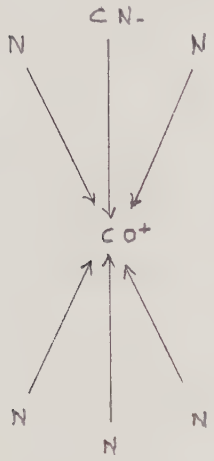
En soumettant la vitamine B_{12} à l'hydrogénation catalytique, en présence d'oxyde de platine, suivie de réoxydation à l'air libre, KACZKA et Coll. ont préparé la vitamine $B_{12\ a}$. D'autre part, en partant d'un extrait de streptomyces aureofaciens LICHTMANN et Coll. , PIERCE et Coll. ont isolé par chromatographie sur silice deux pigments :

- l'un la vitamine B_{12} ;
- l'autre, la vitamine $B_{12\ b}$; caractérisée par un spectre d'absorption avec des sommets, situés à 2730, 3510, 5250 Å.

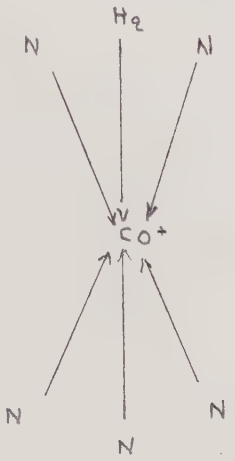
Enfin, SMITH et LENS ont noté dans certains extraits de foie l'existence de fractions colorées, actives dans l'anémie de Biermer et différentes de la vitamine B_{12} .

L'étude du spectre d'absorption de ces dérivés montre qu'il est identique à celui dela vitamine $B_{12\ a}$ de KACZKA et de la vitamine $B_{12\ b}$ de PIERCE. Ainsi la B_{12} est un dérivé cyané et les vitamines $B_{12\ a}$ et $B_{12\ b}$, par ailleurs identiques, correspondent à la vitamine B_{12} , privée de son radical - CN qui est remplacé par - OH : c'est l'hydroxocobalamine.

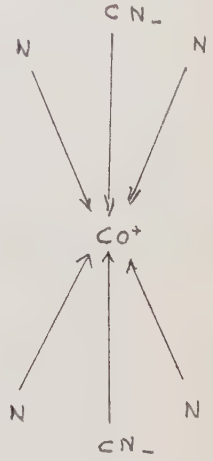
D'après les groupements, liés à l'atome de cobalt, on distingue les complexes suivants de coordination électriquement neutres ou chargés.



Cyanocobalamine
(électro neutre)
ou Vit. B 12



Hydroxocobalamine
(électropositive)
ou Vit. B 12 b



Dicyanocobalamine
(électro négative)

Le caractère électro-positif de l'hydroxocobalamine, sur lequel nous reviendrons, laisse déjà entrevoir une liaison plus forte avec les albumines sériques et tissulaires, chargées négativement.

PHYSIOLOGIE

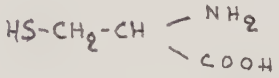
- ROLE DE LA B 12 DANS L'ORGANISME

La vitamine B_{12} est un facteur de croissance essentiel pour de nombreux animaux et pour l'homme.

Elle intervient dans le métabolisme des groupes méthylés labiles et permet la transformation de l'homocystéine en choline par transméthylation. L'existence d'une corrélation entre la vitamine B_{12} et la transméthylation a été démontrée par plusieurs auteurs. Certains ont mesuré les besoins en

choline des poussins, soumis à un régime alimentaire de composition connue, comportant la totalité des vitamines, à l'exception du facteur protéïnique animal, synonyme de vitamine B12 : - un tel régime assure un taux de croissance assez nett, mais faible. Un excès de groupes méthylés labiles l'augmente peu. L'addition à un tel régime d'un extrait de foie, exempt , par ailleurs, de substances méthylées, provoque un accroissement considérable du poids de l'animal, témoin d'une biosynthèse de méthionine! L'extrait de foie, par sa composante vitaminique B_{12} exalte donc les réactions de transfert des groupes méthyles de la choline vers l'homocystéïne.

Methionine Homocysteine



Choline

Ainsi s'explique l'action lipotrope et hépatoprotectrice de la vitamine B_{12} et la possibilité de la remplacer, dans une certaine mesure, par la méthionine ou la choline.

Dans le métabolisme protidique, la vitamine B_{12} intervient donc en exerçant une action protéïno-anabolique : en réduisant l'excrétion d'azote et en favorisant l'incorporation des amino-acides dans les nucléoprotéïnes.

Sur le métabolisme lipidique, la vitamine B_{12} intervient en favorisant la synthèse des lipides complexes et l'utilisation hépatique des acides gras.

Sur le métabolisme glucidique, le rôle de la vitamine B_{12} a été reconnu chez le rat et le poulet, soumis à un régime carencé, mais surtout par les recherches effectuées sur des sujets diabétiques. Cette action se résume en une augmentation de la tolérance aux glucides et dans une exaltation des effets hypoglycémiants de l'insuline.

Parmi les nombreuses hypothèses relatives à l'action pro-insulinique de la vitamine B_{12}, certains auteurs lui admettent une capacité à maintenir réduits les groupes SH essentiels à la fonction du Co-enzyme A et du glutathion. D'autre part, le tropisme pancréatique de la vitamine B_{12} a suggéré à certains l'étude de l'excrétion urinaire de la vitamine chez des diabétiques et des sujets normaux.

Ils constatèrent, chez le diabétique, exempt d'atteintes vasculaires, une élimination urinaire de vitamine B_{12} minime par rapport à celle de sujets normaux, alors que chez les diabétiques, atteints de rétinopathie, l'élimination urinaire de vitamine B_{12} augmente considérablement, atteignant parfois des valeurs cinq à six fois plus élevées que chez les sujets normaux.

Un des plus puissants catalyseurs connus, la vitamine B_{12} intervient dans le métabolisme des acides aminés. Dans la synthèse des nucléoprotéïnes, elle agit comme catalyseur dans la transformation en thymidine de la thymine et du désoxyribose, prenant ainsi part à l'élaboration de la substance nucléaire.

De cette position dans le métabolisme nucléaire, résulte son action essentielle sur l'hématopoïèse en assurant la synthèse de l'hémoglobine et de son élément de base : la protoporphyrine à partir du glycocolle, d'autre part, son absolue nécessité au cours de l'érythropoïèse à la dose de 1 à 2 μgr sur un besoin quotidien global de 6 μgr .

Cet ensemble de propriétés, qui fait participer la vitamine B_{12} aux processus intimes de la vie cellulaire explique son rôle de facteur de croissance et d'activateur de la nutrition, son action hématopoïètique et de trophicité nerveuse, son effet hépatoprotecteur n'étant qu'un des aspects particuliers de ce pouvoir eutrophique général.

- ABSORPTION INTESTINALE

Il est admis que la vitamine B_{12} est le facteur extrinsèque de CASTLE et qu'elle est absorbée dans l'iléon sous l'action d'un facteur intrinsèque, sécrété par l'estomac. Apportée par l'alimentation, liée aux protéïnes, l'action des enzymes protéolytiques du tube digestif rompt, ou non, la liaison protéine-vitamine B_{12} selon le type de la protéine porteuse. Une fois libérée, la vitamine B_{12} naturelle est susceptible de se fixer sur de nouveaux accepteurs protéiques et, en particulier, sur le facteur intrinsèque.

L'action du facteur intrinsèque commande l'absorption physiologique de la vitamine B_{12} . GLASS et Coll. ont montré que chez l'homme normal, cette absorption est limitée : 1,5 microgrammes de vitamine B_{12} marquée au Co 60 sont absorbés au maximum, même si l'on augmente les doses ingérées jusqu'à 50 μgr ; Si l'on ajoute du facteur intrinsèque, la quantité absorbée augmente modérément, mais reste limitée. A un certain rapport entre doses de facteur intrinsèque et de vitamine B_{12} correspond l'absorption optimale. Si l'on augmente les quantités de facteur intrinsèque, l'absorption , loin d'être accrue, est déprimée. Ces faits conduisent naturellement à l'idée d'un blocage physiologique de l'absorption intestinale de la vitamine B_{12} Il est également démontré que, après administration d'une dose convenable de vitamine B_{12}, une nouvelle ingestion tombait dans une véritable phase rétractaire d'absorption, qui disparaît après un certain temps.

Après ingestion de vitamine B_{12} marquée au Co 60, la radioactivité ne commence à apparaître dans le plasma que 3 ou 4 heures après. Ce temps de latence correspond à la rétention de la vitamine B_{12} dans la muqueuse intestinale. Cependant, la période réfractaire de l'absorption ne répond pas à ce temps

de latence : la muqueuse a récupéré ses possibilités d'absorption bien avant que la vitamine B_{12} marquée ait disparu de la paroi du grêle.

Aussi, certains auteurs pensent-ils qu'il existe un accepteur intermédiaire entre la lumière intestinale, contenant le complexe vitamine B_{12} - facteur intrinsèque et la cellule. Cet accepteur pourrait avoir une affinité non pour la vitamine B_{12} mais pour le facteur intrinsèque. Il pourrait être une "protéine contractile", située à la surface des cellules intestinales, permettant l'absorption du complexe Vitamine B_{12} - - facteur intrinsèque par un phénomène de pinocytose. Enfin, l'absorption intestinale de la B_{12} nécessite la présence d'ions calcium.

Telles sont, avec leurs certitudes, les séquences possibles de l'absorption intestinale de la vitamine B_{12}, administrée à des doses physiologiques. Cependant, un autre mécanisme pourrait intervenir : en présence de grosses quantités de vitamine B_{12}, l'ingestion de celles-ci détermine une flèche de cyanocobalaminémie précoce et une élimination urinaire rapide : l'absorption serait une simple diffusion à travers la membrane intestinale. La vitamine B_{12} apparaîtrait alors dans le plasma à l'état libre, alors qu'elle y est liée à une protéine après l'absorption de doses physiologiques.

DEUXIEME PARTIE

VITAMINE B12 RETARD PAR ADJONCTION D'UN VEHICULE RETARD

La découverte de la cyanocobalamine représente une date indiscutable , son application thérapeutique a permis des résultats spectaculaires dans le traitement de certains états carentiels.

Efficacité certaine et indiscutée, deux problèmes subsistaient :

- d'une part, son passage éphémère dans le sang circulant et,
- d'autre part, son élimination urinaire rapide, dès les premières heures.

Des doses importantes, des injections fréquentes étaïent donc nécessaires et tout naturellement depuis plusieurs années des tentatives ont été faites pour rechercher une solution à effet retard.

Le maintien dans l'organisme du principe actif est obtenu grâce à l'adjonction de substances étrangères, faisant fonction de véhicu les retard et freinant ainsi l'élimination trop rapide de la cyanocobalamine.

Successivement, on utilisa comme substances retard : l'huile de sésame, la gélatine, le monostéarate d'aluminium , sans résultats probants.

L'association de la cyanocobalamine à un complexe acide tannique -zinc a permis d'obtenir un produit, selon un processus s'apparentant à celui des insulines retard (I.P.Z.) qui, par solubilité différée au point d'injection , retardant donc le passage du produit actif dans le système circulatoire, a donné des taux sanguins plus durables et une élimination urinaire plus retardée.

Après injection d'une dose identique de 1000 μgr de cyanocobalamine et du complexe B_{12} - tannate de zinc à des sujets normaux, GLASS et Coll. ont montré que le complexe provoquait :

- une flèche de cyanocobalaminémie basse à la 6ème heure ;
- une augmentation progressive du taux sanguin de la 24ème heure à la 72ème heure ;
- un taux sanguin stable pendant deux semaines, alors que pour une dose identique de cyanocobalamine, l'activité du sérum devenait nulle à partir de la 24ème heure.

Ces résultats, que nous schématisons sur une courbe, empruntée à GLASS, ont été retrouvés par de nombreux auteurs et l'in admet avec le complexe zinc-tannate une activité durable pendant deux semaines.

De même, chez le rat, on a montré qu'après une injection de 500 μgr du complexe retard, il n'y avait pratiquement pas d'excrétion urinaire de la vitamine. HEINRICH et GABBE ont trouvé des résultats identiques : élimination urinaire totale très retardée, rétention supérieure au lieu d'injection et donc activité correspondante dans le sang.

L'emploi du complexe B_{12} - tannate de zonc , qui constituait une possibilité de charge hématique en vitamine B_{12} plus stable et plus durable, marquait déjà un progrès dans la vitaminothérapie B_{12} .

L'idée d'un effet retard n'était plus une fiction : l'étude de la vitamine $B_{12\,b}$ ou hydroxocobalamine allait permettre d'envisager un effet retard remarquable.

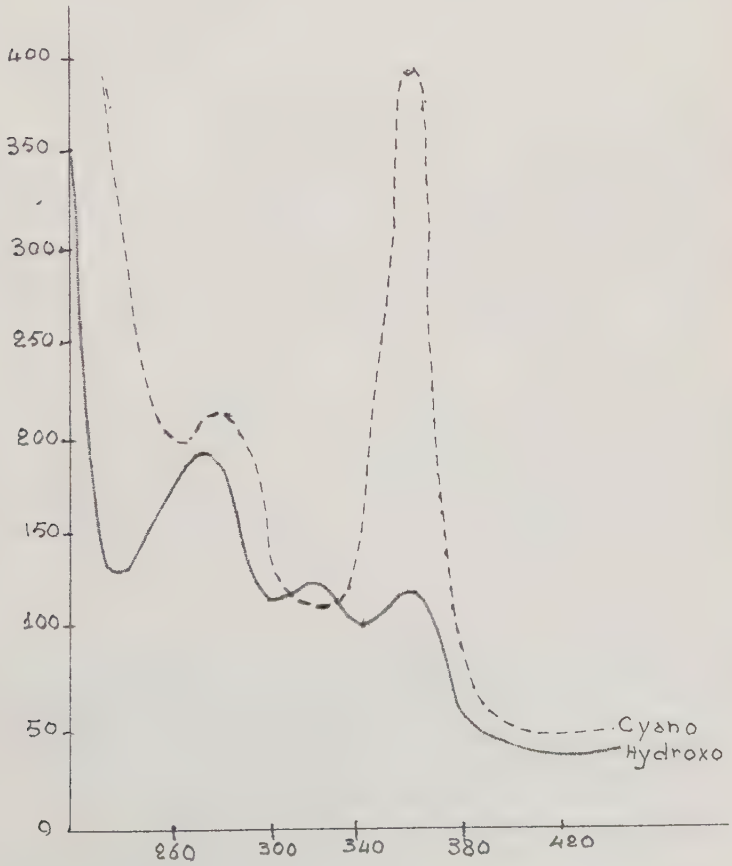
TROISIEME PARTIE

HYDROXOCOBALAMINE VITAMINE B 12 b

- CARACTERES PHYSICO-CHIMIQUES

L'hydroxocobalamine correspond donc à la vitamine B_{12} privée de son radical -CN, qui est remplacé par -OH. Elle se présente sous l'aspect d'une poudre rouge orangé, soluble dans l'eau, l'éthanol ; insoluble dans l'éther et l'acétone.

Son spectre d'absorption est différent de celui de la cyanocobalamine, présentant des maxima à 2730, 3510, 5250 Å



L'étude spectrophotométrique sous infrarouge montre l'absence de la bande correspondant au groupement -CN.

METHODES D'INVESTIGATION

Les méthodes de dosage microbiologique et biologique, sur lesquelles nous ne reviendrons pas, sont celles utilisées pour le titrage de la cyanocobalamine. L'utilisation des Lactobacilli :

- Lactobacillus lactis Dorner,
- Lactobacillus Leichmanii

confirme l'identité de l'activité biologique des deux cobalamines, ainsi que le test de croissance du jeune rat, cependant les cultures obtenues sont moins abondantes qu'avec la cyanocobalamine.

La possibilité de marquer la vitamine B_{12} a rendu de grands services et l'étude de l'hydroxocobalamine a profité de cette méthode.

On essaya d'abord de laisser au contact de la vitamine B_{12} en solution avec P_{32} et Co_{60}, même pendant des mois, même en variant les conditions expérimentales, on ne réussit pas l'échange des isotopes avec les éléments normaux P31 et Co_{59}. Par contre, l'addition de sulfate de Co_{60} à un bouillon inoculé par streptomyces griseus permit d'obtenir biologiquement une vitamine B_{12} radio-active à 12 millicuries par mg.

Les micro-organismes ont aussi accepté du P_{32} et même du 5,6 diméthylbenzimidazole à C_{14} marqué sur les $-C H_3$ comme précurseurs de B_{12}. L'irradiation directe de B_{12} cristallisée par des neutrons donnerait un produit à P et Co radioactifs, mais avec perte de CN et pour certains, la radioactivité, ainsi obtenue, serait insuffisante pour les recherches biologiques.

La vitamine B_{12}, marquée à Co_{60}, a rendu de grands services dans l'étude de la physiologie du facteur intrinsèque. Sa demi-vie étant très longue, il n'y a pas à tenir compte de la baisse de la radioactivité au cours des expériences. Chez l'homme, il suffit, pour GLASS, de 0,5 μg pour une expérience.

Au Co_{60}, on a substitué le Co_{58} de demi-vie égale à 72 jours, donc moins dangereuse.

ETUDE PHARMACOLOGIQUE

TOXICITÉ

- L'essai de toxicité aiguë a été pratiqué sur un lot de 10 souris femelles pesant 18 à 22 grammes. L'hydroxocobalamine en solution aqueuse à la concentration de 20 mg. par ml., a été administrée par voie sous-cutanée à la dose de 200 mg./kg. Les animaux furent gardés en observation pendant une semaine : aucun signe d'intoxication n'a été relevé, aucune mortalité n'a été observée.

- L'essai de toxicité semi-chronique a été pratiqué sur de jeunes rats mâles pesant 120 grammes. L'expérimentation a porté sur deux lots de rats :

  . un lot, de 10 rats, reçut l'hydroxocobalamine par voie sous-cutanée, à la dose quotidienne de 2 mg./kg. , soit une dose 100 fois supérieure à la dose thérapeutique humaine de 1000 γ pour un homme de 50 kg.

  . un autre lot de 10 rats témoins reçut dans les mêmes conditions du sérum physiologique .

  Les animaux furent gardés en observation et pesés 3 fois par semaine avec, en fin d'expérience, contrôle hématologique et sacrifice de tous les animaux.

Les constatations suivantes ont été faites :

- Etat général : excellent dans les 2 lots.

- La croissance pondérale a été normale et aucune différence significative n'a été relevée, comme le montre le tableau suivant :

	Poids en grammes le premier jour	Poids en grammes le dernier jour
Témoins	126	244
Traités	122	215

- Aucune mortalité n'a été observée.

- L'examen hématologique , pratiqué en fin d'expérience sur cinq rats de chaque lot ne révèle aucune anomalie quantitative :

	Hématies par mm3	Leucocytes par mm3
Témoins	6.000.000	11.600
Traités	6.300.000	13.400

Une autopsie a été pratiquée dans tous les cas avec examen anatomopathologique :

- il n'existait aucune trace au lieu d'injection, la résorption a toujours été excellente sans aucune réaction locale ;

- l'examen microscopique des coupes de foie et de rein révélait un aspect strictement normal dans les deux lots.

A une dose quotidienne de 2 mg/kg, l'hydroxocobalamine n'a exercé aucun effet toxique sur la croissance, l'état général des animaux, aucune anomalie hématologique, aucune lésion hépato-rénale.

- EXPERIMENTATION ANIMALE CHEZ LE CHIEN

A SKEGGS et Coll. , nous devons une expérimentation animale de l'hydroxocobalamine ; ces auteurs , par des méthodes biologiques classiques, ont comparé l'activité du sérum en vitamine B_{12} de deux lots de chiens, nourris de façon identique et recrutés selon des critères semblables, après une injection intra-musculaire d'une dose de 500 d'hydroxocobalamine d'une part, de cyanocobalamine, d'autre part.

De façon constante, les concentrations sanguines de vitamine B_{12} se sont révélées toujours plus élevées après injection d'hydroxocobalamine.

	5ème heure	24ème heure	48ème heure	96ème heure
Hydroxocobalamine	15,70	3,98	1,86	1,06
Cyanocobalamine	13,20	1,32	0,91	0,79

Concentration de vitamine B_{12} en $\mu gr/ml$.

Recherchant la raison de cette prolongation d'activité après administration d'hydroxocobalamine, les auteurs ont émis l'hypothèse que cette dernière aurait une plus grande affinité pour les protéines sanguines, formerait avec elles de véritables formes de réserve, qui ne pourraient être éliminées telles quelles dans lesurines. Pour soutenir leur théorie, les auteurs ont déterminé les quantités de vitamine B_{12} liée, retrouvées dans le sérum des animaux, divisés en deux lots comme précédemment.

Après injection de 500μgr des deux cobalamines et comme le montre le tableau ci-après, les complexes vitamines B_{12} - protéines ont été trouvés plus nombreux après injection d'hydroxocobalamine.

	HYDROXOCOBALAMINE		CYANOBALAMINE	
	totale	liée	totale	liée
5ème heure	20,6	6,25	8,81	1,05
24ème heure	5,28	1,60	1,81	0,62
48ème heure	1,81	0,85	0,78	0,59

Concentration de B_{12} en µgr/ml.

De façon constante, l'étude pharmacologique de l'hydroxocobalamine chez l'animal affirme :

- l'absence de toxicité,
- l'obtention de concentrations sanguines élevées, supérieures à celles obtenues avec la cyanocobalamine.

QUATRIEME PARTIE

INTERET DE L'HYDROXOCOBALAMINE

EFFET RETARD

Le caractère électro-positif de la molécule d'hydroxocobalamine permettait de supposer une liaison plus forte avec lesprotéines sériques et tissulaires, chargées négativement, au point que très vite on pensa que l'hydroxocobalamine était douée d'un effet retard, d'autant plus appréciable qu'il s'agissait d'une forme naturelle de la cyanocobalamine.

Précurseur chez l'animal, SKEGGS montra la supériorité des taux sanguins obtenus ; chez l'homme des recherches furent entreprises sur le métabolisme de l'hydroxocobalamine.

GLASS et Coll. d'une part, HEINRICH et GABBE, d'autre part, MILHAUD, enfin, ont étudié le métabolisme des vitamines B_{12} et $B_{12\ b}$ en ayant recours soit à des dosages biologiques, soit à des préparations marquées (CO 58) détectées au cours des mesures par des compteurs à scintillations, mais tandis que GLASS et Coll. recherchaient la décroissance de la radioactivité de la zone d'injection, que HEINRICH et GABBE calculaient le bilan de la vitamine B_{12} d'après la rétention intestinale, mesurée pendant un an, MILHAUD étudiait directement sang, urines et aire hépatique.

- CONCENTRATION SANGUINE

GLASS et Coll. à des sujets ayant un taux sanguin normal de B_{12} et dépourvus de toute atteinte rénale, sanguine, administrent en une seule fois par voie intra-musculaire une dose de 1000 μgr d'hydroxocobalamine et de cyanocobalamine.

Pendant une période de trois semaines, les taux sanguins en vitamine B_{12} furent nettement plus élevés après

une injection unique d'hydroxocobalamine qu'après une dose identique de cyanocobalamine. Tandis que les taux initiaux sanguins ne montraient aucune différence, les taux moyens furent :

- 4 fois plus élevés à la 5ème heure ;
- 12,8 " " " " 24ème "
- 5,2 " " " " 72ème "

qu'après une dose identique de cyanocobalamine.

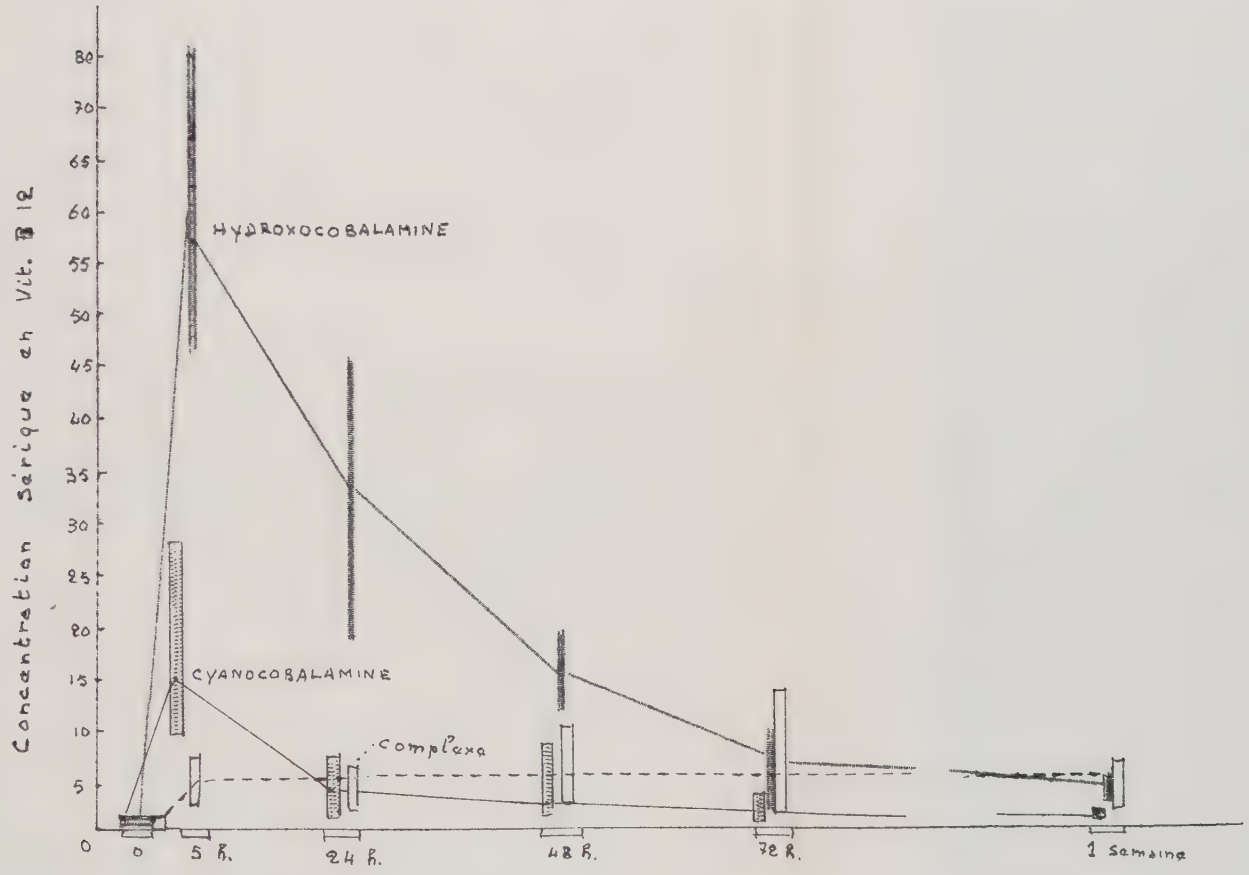
Par rapport à une dose identique du complexe B_{12} -tannate de zinc, les taux moyens sanguins furent avec l'hydroxocobalamine :

- 15,5 fois plus élevés à la 5ème heure
- 11 " " " " 24ème "
- 3,8 " " " " 48ème heure.

MILHAUD, par voie intramusculaire, administre 1000 γ d'hydroxocobalamine à 9 malades et une dose identique de cyanocobalamine à 6 malades. Des prises de sang sont pratiquées à la 4ème, 5ème, 24ème , 48ème et 144ème heure, après l'injection. De façon constante, les taux sanguins, de la 4ème heure à la 144ème heure sont plus élevés avec l'hydroxocobalamine qu'avec une dose identique de cyanocobalamine, comme le montrent les courbes, empruntées à ces auteurs.

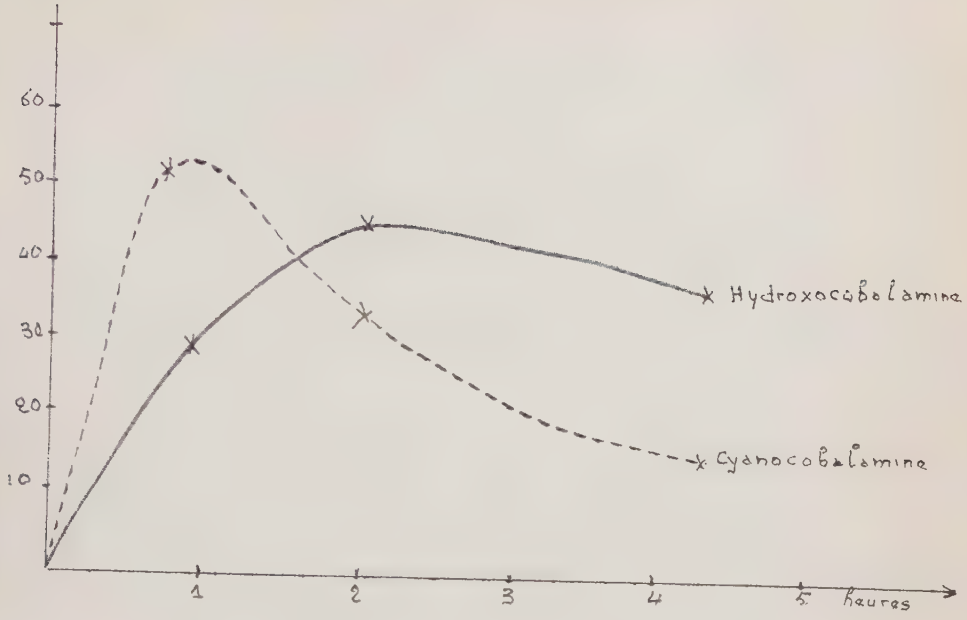
- ELIMINATION URINAIRE

L'élimination urinaire, après injection intramusculaire unique de 500 ou 1000 d'hydroxocobalamine, atteint seulement 16 et 27 % respectivement au bout de 72 heures, tandis que, dans les mêmes conditions, avec des doses identiques de cyanocobalamine, l'élimination urinaire atteint 60 et 69 % . Comme nous le verrons, ce retard à l'élimination urinaire n'est pas dû à un mauvais fonctionnement rénal, mais à un retard à l'apport rénal.



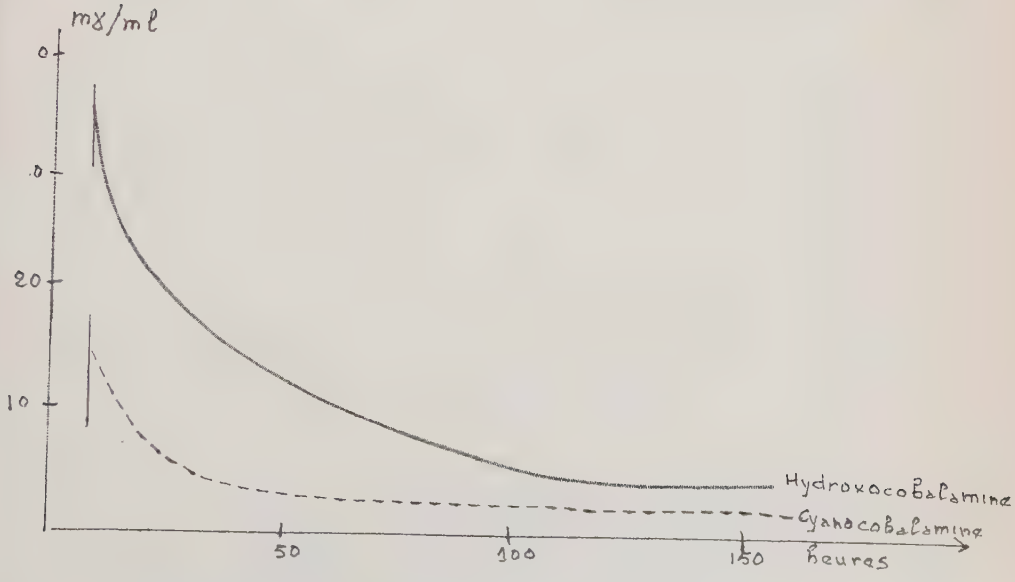
Taux sanguins de Vitamine B 12 à la suite d'une injection de 1.000

- d'Hydroxocobalamine,
- de Cyanocobalamine
- de Complexe B 12 Tannate de Zinc



Evolution en fonction du temps des taux sanguins en Cobalamines après injection intra- usculaire de 1.000 γ

(moyenne de 4 malades)



Variation en fonction du temps des taux sanguins en Cobalamines après injection intra-musculaire 1000 .

(moyenne 9 malades)

KILLANDER et Coll. comparant l'élimination urinaire des 2 cobalamines, obtiennent les résultats suivants :

- Avec une dose de 500 µgr et 1000 µgr de cyanocobalamine, marquée au CO_{60}, l'élimination urinaire est maxima au bout de 24 heures, insignifiante pendant les jours suivants.

dose en µgr	0-24 h.	24-48 h.	48-72 h.	total en µgr	pourcent.
500	394	1	1	396	79
500	435	2	2	439	88
1000	782	12	3	797	80
1000	870	5	2	877	88

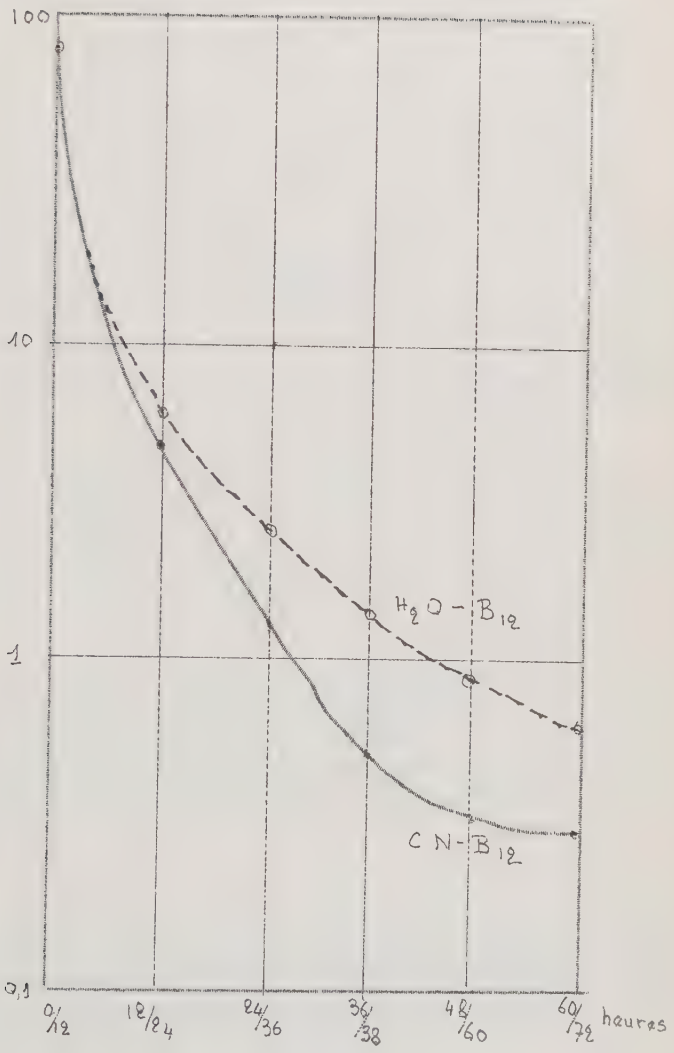
Cyano. marquée CO_{60}

- Avec des doses identiques d'hydroxocobalamine marquée au CO_{57} la plus grande partie est éliminée dès les 24 premières heures mais au cours des 2 jourssuivants, l'élimination est encore importante. L'excrétion totale est inférieure avec l'hydroxocobalamine qu'avec la cyanocobalamine.

dose en µgr	0-24 h.	24-48 h.	48-72 h.	total en µgr	pourcent.
500	220	17	12	249	50
500	258	22	6	286	57
1000	455	87	33	575	58
1000	463	57	17	537	54

Hydroxo. marquée au CO_{57} .

HEINRICH et GABBE confirment encore ces résultats : l'élimination maxima (72-96 %) des deux cobalamines a lieu dans les 12 premières heures. Entre la 12ème et la 24ème heure, l'excrétion varie de 2 à 10 % et l'on peut dire qu'au cours des 24 premières heures, il n'existe pas de différence notable dans le temps, entre l'excrétion urinaire des deux cobalamines.



Excrétion urinaire dans le temps de la Vitamine B_{12} après injection intra-musculaire de 500 μgr des deux Cobalamines.

Aux 2ème et 3ème jours, après une injection d'hydroxocobalamine, une part relativement plus importante de la quantité d'excrétion totale est excrétée.

- FIXATION HEPATIQUE

L'expérimentation animale montre que le rapport du taux de vitamine B_{12} du rein, qui traduit l'élimination de la vitamine, au taux de vitamine B_{12} du foie, qui reflète son stockage hépatique, est notablement moins élevé après administration parentérale de l'hydroxocobalamine (1,1 à 2,6) qu'après une même dose de cyanocobalamine (4,3 à 6,5) mettant ainsi en évidence la meilleure fixation hépatique de l'hydroxocobalamine.

GLASS déjà signalait cette meilleure fixation, retrouvée de façon constante. KLINGER et DALLE COSTE notent même dans un cas une augmentation progressive de la radioactivité hépatique, débutant trois jours après l'injection et se poursuivant pendant les trois semaines suivantes.

Cette augmentation de la concentration hépatique en cobalamine est d'un grand intérêt thérapeutique. MILHAUD récemment a repris cette étude : par la mesure de la radioactivité hépatique après injection intramusculaire d'une dose de 1000 γ d'hydroxocobalamine chez neuf malades, de cyanocobalamine chez six malades.

Dans tous les cas, la quantité totale de radioactivité administrée a été la même et l'on peut dire que le rapport de fixation hépatique $\frac{\text{hydroxoco}}{\text{cyanoco}}$ est égal à 1,5 en ne tenant pas compte des variations individuelles et à 1,8 en pratiquant des épreuves doubles chez le même sujet.

- ABSORPTION A PARTIR DU LIEU D'INJECTION

L'absorption de l'hydroxocobalamine marquée à partir des points d'injection se fait aussi plus lentement : six jours après administration parentérale 3,5 à 4% de la dose injectée sont encore détectés au niveau des muscles fessiers, cependant qu'avec la cyanocobalamine, le pourcentage tombe à 0,5 et 1 %.

- ABSORPTION INTESTINALE ET RETENTION ORGANIQUE

HEINRICH et Coll. comparant le comportement métabolique des 2 cobalamines, étudient leur absorption intestinale. Après administration orale de 0,10-0,50 n/mol d'hydroxocobalamine 60 chez des sujets normaux et atteints d'anémie pernicieuse compensée, l'hydroxocobalamine présente dans les deux cas une absorption intestinale identique à celle de la cyanocobalamine.

On admet que la résorption intestinale de la vitamine B_{12} est calculée d'après l'excrétion fécale de la cyanocobalamine non résorbée. Si on utilise le test d'excrétion urinaire, on obtient des résultats faux, en ce qui concerne la résorption de l'hydroxocobalamine, étant donné que, résorbée dans les mêmes proportions que la cyanocobalamine , elle est davantage retenue dans l'organisme. A la suite de cette plus forte rétention organique de l'hydroxocobalamine résorbée, l'excrétion urinaire est beaucoup plus basse.

0,10 n mol 60 CO B12	CYANOCOBALAMINE élimination fécale	résorption	élimination urinaire	HYDROXOCOBALAMINE élimination fécale	résorption	élimination urinaire
sujets normaux	16,9	80,4	4[illegible],9	26	74	11,1
	20,5	79,5	43,2	30,3	69,7	7,3
	13,8	86,2	46,6	18,9	81,1	12,3
Biermériens	39,7	60,3	26,5	39,2	60,8	8
	55,5	44,5	31	49,4	50,6	6,8
	24,2	75,8	42	23,9	76,1	5,4

Résorption intestinale et excrétion urinaire
de Cyano et d'Hydroxo pures, marquées.

D'une façon générale, l'écart de rétention entre hydroxo et cyano croît en même temps que les doses augmentent.

- COMPARAISON DES POSOLOGIES

HEINRICH et GABBE, après avoir calculé le bilan de la vitamine B_{12} dans l'organisme d'après la rétention, mesurée pendant un an avec un détecteur de radioactivité à scintillateurs liquides, de la Co 60 B12 résorbée par l'intestin (temps de vie 800 jours) et d'après le pool de B_{12} déterminé microbiologiquement (6,25 µgr /jour), il a été possible de calculer la posologie thérapeutique nécessaire pour couvrir les besoins en vitamine B_{12}.

En prenant comme base un taux quotidien de 6,25 µgr il résulte de ces recherches qu'il suffit pour normaliser le métabolisme de la vitamine B_{12} chez l'homme : soit d'une injection de 500 µgr de cyanoco tous les 14 jours, soit d'une injection de 500 µgr d'hydroxoco tous les 37 jours. Cet intervalle,

déjà hautement significatif, le devient davantage encore avec une dose double (1000 µgr.), où la répétition des injections passe de 16 jours pour la cyanocobalamine à 49 jours pour l'hydroxocobalamine.

MECANISME D'ACTION

Comment peut-on expliquer l'effet retard de l'hydroxocobalamine ?

Plusieurs mécanismes s'affrontent :

- L'excrétion urinaire est plus retardée que celle de la cyanocobalamine .

- La résorption au niveau du lieu d'injection est plus lente que pour la cyanocobalamine.

Pour MILHAUD, le mécanisme de l'effet retard de l'hydroxocobalamine s'explique par une résorption plus lente au niveau du lieu d'injection, ce qui rejoint l'hypothèse de GLASS, que nous avons signalée déjà.

En effet :

- après injection intraveineuse, l'hydroxocobalamine est excrétée par le rein de façon tout à fait semblable à la cyanocobalamine.

- l'excrétion urinaire de la cyanocobalamine est identique, qu'elle soit injectée par voie intramusculaire ou intraveineuse.

- l'excrétion urinaire de l'hydroxocobalamine est plus faible, lorsqu'elle est injectée par voie intramusculaire que par voie endoveineuse.

L'effet retard de l'hydroxocobalamine ne peut donc résulter d'une excrétion rénale plus lente de ce produit.

Mais, d'autre part, d'après HEINRICH et GABBE, l'hydroxocobalamine aurait une plus grande facilité à former des complexes avec les protéines sériques, ce qui entraînerait une circulation sanguine plus prolongée, une plus haute concentration et donc une excrétion urinaire retardée et diminuée.

Les résultats de ces auteurs, obtenus par l'étude microbiologique de la concentration sérique et de l'excrétion urinaire, tendent à confirmer cette hypothèse.

L'hydroxocobalamine , électro-positive , comme cela est mis en évidence par chromatographie sur colonnes de cellulose à échange de cations, opère vraisemblablement dans l'organisme une liaison non spécifique avec les protéines et, en particulier, les globulines α_1 et α_2 du sérum et des tissus, qui lui confère son effet retard.

CINQUIEME PARTIE

INTERET CLINIQUE DE L'HYDROXOCOBALAMINE

TOLERANCE

La découverte de la cyanocobalamine constituait déjà une nouveauté et son application thérapeutique une étape décisive dans le traitement de l'avitaminose B_{12} sous ses deux aspects cliniques majeurs : hématologique et neurologique.

L'hydroxocobalamine, en tant que facteur vitaminique B_{12} , lui est entièrement superposable et sa tolérance reste excellente : en effet, parmi un certain nombre d'observations, faites à l'Hôpital de l'Institut Pasteur, de Paris, dans le Service du Docteur MARTIN.

- une légère douleur, d'ailleurs fugace, au point d'injection, dans 12 % des cas ;

- une rougeur locale dans 5 % des cas ;

- aucune réaction générale d'intolérance, abstraction faite de quelques phénomènes, qui nous ont paru devoir être imputés aux traitements antibiotiques associés.

Mais alors que la cyanocobalamine passe rapidement dans le sang et s'élimine très vite dans les urines, nécessitant la répétition des injections, l'hydroxocobalamine , résorbée plus lentement, maintient dans l'organisme une concentration plus élevée en B_{12} et pendant plusieurs jours : les possibilités thérapeutiques seront ainsi souvent majorées en ce qui concerne l'intensité et la rapidité des résultats obtenus.

En raison de l'identité biologique en tant que facteur vitaminique B_{12}, nous n'insisterons pas sur les indications thérapeutiques de l'hydroxocobalamine, mais il ne nous paraît pas inutile de rappeler,d'une part,l'action antianémique de l'hydroxocobalamine et, d'autre part, son intérêt dans le traitement des neuropathies périphériques des diabétiques.

EFFET HEMATOLOGIQUE

A LICHTMANN et Coll., nous emprunterons quelques observations d'anémie de Biermer traitées par l'hydroxocobalamine : leurs résultats reposant sur un double critère d'efficacité : hématologique et clinique.

Chez cinq malades, dont l'âge variait de 55 à 75 ans, ayant tous une anémie de Biermer confirmée avec mégaloblastose médullaire, achylie histamino-résistante au tubage gastrique, l'hydroxocobalamine fut administrée, chaque jour, pendant 21 jours, par voie intramusculaire, à des doses variant de 1 à 2 microgrammes. Pour de telles doses, on assiste à une crise réticulocytaire parfois inférieure aux prévisions, mais surtout et dans tous les cas observés, à une régénération de la lignée rouge au terme des trois semaines de traitement, résultats obtenus sans adjonction d'extraits hépatiques et sans recours à de petites transfusions.

dose quotidienne d'hydroxocobalamine en µgr.	1	1	1	1,5	2
G.R./mm3 chiffre initial	1.900.000	2.600.000	1.740.000	1.750.000	1.470.000
- jour de la crise réticulocytaire	8	8	9	7	9
- réticulocytose max. en %	11,4	14	18	9	15,1
G.R. après trois semaines par mm3	3.060.000	4.360.000	2.840.000	3.170.000	2.950.000

Résultats hématologiques obtenus après traitement
par l'Hydroxocobalamine
dans cinq cas d'anémie de Biermer

Ces résultats s'accompagnent d'une amélioration clinique spectaculaire , affirmant l'identité des deux cobalamines dans le traitement de l'anémie pernicieuse. Cette amélioration débute vers le 3ème, 4ème jour du traitement et se manifeste par :

- reprise de l'appétit, sensation de bien-être ;
- disparition de la glossite de Hunter en 10 jours ;
- disparition des paresthésies dans tous les cas ;
- dans un cas de sclérose combinée subaiguë de la moëlle, associant un syndrôme pyramidal à la fois déficitaire et de libération et un syndrôme cordonnal postérieur, les auteurs observèrent la disparition en trois semaines d'un signe de Romberg.

L'application thérapeutique de la cyanocobalamine avait déjà donné des résultats remarquables dans l'évolution de ce syndrôme :

- disparition des troubles de la sensibilité profonde
- régression du syndrôme pyramidal ;
- régression plus lente des signes neurologiques objectifs (aréflexie tendineuse-signe de Babinski).
- mais persistance durable des paresthésies, qui avec l'hydroxocobalamine disparaissent rapidement et dans tous les cas.

Enfin, chez un sixième malade, atteint de maladie de Biermer, avec une anémie de base à 2.090.000 globules rouges par mm^3, les auteurs tentèrent une administration orale de 5 μgr d'hydroxocobalamine par jour , pendant 10 jours : aucune réponse, sinon une très large variation des réticulocytes (0,4 % à 1,4 %). A cette thérapeutique, les auteurs ajoutèrent 150 cc. de suc gastrique neutralisé , par jour et pendant 12 jours. Ils constatèrent :

- une augmentation lente des réticulocytes à partir du 8ème jour, avec maximum au 11ème jour ; parallèlement une augmentation des globules rouges ;
- une lente mais définitive amélioration clinique.

EFFET DANS LE TRAITEMENT DES NEUROPATHIES DIABETIQUES

Certains auteurs avaient noté d'excellents résultats avec la cyanocobalamine dans le traitement des polynévrites diabétiques : disparition des douleurs et des crampes, puis, secondairement, des troubles objectifs de la sensibilité.

Ces constatations ne nous étonnent qu'à moitié en raison de la participation de la vitamine B_{12} au métabolisme glucidique.

Des résultats supérieurs ont été obtenus avec l'hydroxocobalamine : à KLINGER et DALLE COSTE, nous emprunterons quelques observations :

A.M. ... , âgé de 55 ans :

Présente depuis quatre ans un diabète sans acidose :

- glycémie basale 2,10 g. - 2,30 g.
- glycosurie totale par 24 h. : 20-25 g.
- T.A. 16½-9
- pas d'intoxication exogène, pas de syphilis.

Depuis 10 jours, apparition d'une lombosciatique bilatérale, traitée seulement par les antalgiques usuels.

La radiographie vertébrale montre une arthrose lombaire avec ostéophytose marginale pluri-vertébrale.

Avec une ampoule par jour de 1000 microgrammes d'hydroxocobalamine, pendant 20 jours consécutifs, on observe :

- au 8ème jour : amélioration considérable : diminution des douleurs, des paresthésies ;
- au 15ème jour : disparition totale des douleurs, marche paranormale ;
- objectivement : disparition des points douloureux de Valleix, pas de signe de LASEGUE.

A.C.... ;diabétique de 52 ans.

Diabète instable, sans acidose .

- glycémie 1,85 g. - 2,60 g.
- glycosurie : 20 à 60 g.
- T.A. : 19-10.

Apparition d'une polynévrite des membres inférieurs avec paresthésies intenses et s'accompagnant de douleurs intercostales très vives.

Le malade est traité par la cyanocobalamine à raison de 1000 microgrammes par jour, sans modification notable. On maintient la même posologie en utilisant de l'hydroxocobalamine pendant trente jours :

- au 7ème jour de ce nouveau traitement, diminution des douleurs et des paresthésies ; amélioration progressive et persistante.

- Au 30ème jour : guérison apparente avec réflexes ostéotendineux des membres inférieurs normaux, alors qu'ils étaient précédemment diminués.

R.G.... , âgée de 64 ans ;

Atteinte depuis cinq ans de diabète léger, stable, sans acidose .

- glycémie : 1,15 g. - 1,40 g.
- glycosurie : 0
- T.A. : 17-9

Apparition de névralgie brachiale droite avec contracture de l'épaule. La radiographie cervico-dorsale montre des lésions arthrosiques. L'articulation scapulo-humérale droite est indemne.

Un traitement par les antalgiques et les antirhumatismaux ne donne aucun résultat ni sur les douleurs, ni sur la contracture.

On commence un traitement par l'hydroxocobalamine, à raison de 1 ampoule de 1000 microgrammes par jour et pendant 20 jours :

- dès le 3ème jour : la malade accuse une diminution nette des douleurs, et de la contracture ;
- au 6ème jour : disparition complète des douleurs avec persistance pendant encore quelques jours de légères paresthésies.
- objectivement : on constate au 6ème jour du traitement, une amélioration très nette des mouvements passifs de l'articulation de l'épaule, précédemment bloquée et, au 9ème jour, disparition des points douloureux cervico-dorsaux.

R.E.... , âgé de 59 ans.

Atteint depuis 18 ans de diabète moyen, stable, sans acidose.

- glycémie : 1,95 g. - 2,20 g.
- glycosurie par 24 h. : 5 - 15 g.
- T.A. : 20 - 10.

Polynévrite diabétique avec douleurs lancinantes dans les bras, les membres inférieurs , accompagnées de troubles vaso-moteurs et sécrétoires (sensation de froid avec hyperhydrose) de paresthésies et dysesthésies dans les territoires intéressés.

Un traitement par la cyanocobalamine est commencé , à raison de 2000 microgrammes par jour, pendant 20 jours, avec pour résultats une légère rémission, d'ailleurs épisodique, des crises douloureuses, mais persistance des troubles vaso-moteurs et sécrétoires, des paresthésies.

On remplace les injections de cyanocobalamine par l'hydroxocobalamine, à raison de 5000 microgrammes tous les 3 jours, pendant 35 jours.

- à partir du 7ème jour : on assiste à une régression très nette des douleurs, des paresthésies et des troubles vaso-moteurs et sécrétoires associés.
- après 15 jours : disparition totale des douleurs et persistance légère des paresthésies. Le malade accuse un bénéfice subjectif important et reprend une activité normale.

OBSERVATIONS PERSONNELLES

L'action antalgique de l'Hydroxocobalamine nous semble très intéressante ; signalée et étudiée par de nombreux auteurs chez des sujets diabétiques, nous l'avons observée à plusieurs reprises chez des sujets à glycémie normale . Nous citerons, pour terminer, quelques observations personnelles, dues à l'obligeance du Docteur SUREAU.

S.M.... , âgé de 76 ans.

Est atteint, depuis 20 ans environ, d'une polyarthrite chronique évolutive, stabilisée avec déformation des mains et coxarthrose droite.

La hanche droite est bloquée et la radiographie montre un pincement de l'interligne, une ostéophytose importante.

Brutalement chez ce malade s'installe un syndrôme algique d'une rare violence, avec lombalgie et irradiation sciatique droite.

A l'examen :

- point douloureux L5-SI, avec contracture paravertébrale ;
- douleur sciatique du membre inférieur droit, type SI ,
- signe de LASEGUE .

La radiographie lombaire montre un pincement avec discarthrose L5-SI.

Cette sciatique hyperalgique est rebelle aux antalgiques habituels et à la Butazolidine. Devant l'échec de cette thérapeutique et l'intensité des douleurs, le malade est mis au traitement suivant : une injection intramusculaire, tous les deux jours, de 5.000 gammas d'Hydroxocobalamine.

- dès la 2ème injection : soulagement net des douleurs et reprise de la marche;
- à la 3ème injection : disparition du syndrôme douloureux, le signe de LASEGUE a disparu et la marche est redevenue normale.

Le traitement est poursuivi quelques jours.

M.B... , âgée de 34 ans.

Présente une névralgie cervico-brachiale gauche :

- douleurs vives du membre supérieur
- impotence fonctionnelle ;
- la mobilisation de l'articulation est douloureuse ; radiologiquement : aucune lésion osseuse.
- la radiographie de la colonne cervicale met en évidence une image d'arthrose.

Devant l'échec des antalgiques, la malade est mise à l'hydroxocobalamine à raison d'une ampoule de 1000 microgrammes tous les deux jours.

- à la 2ème injection : on assiste à la régression des douleurs.

L'amélioration se poursuit : disparition totale des douleurs après dix jours de traitement.

M.G.... , âgée de 57 ans.

Est hospitalisée dans le service pour anémie hypochrome.

A son entrée, la malade est asthénique, anorexique, pâle, les muqueuses sont décolorées. Elle se plaint de douleurs diffuses .

Examen cardio-vasculaire :

- pouls régulier à 80,
- tension artérielle : 11-6
- souffle systolique de pointe anémique.

Examen pulmonaire : râles discrets dans les deux champs.

Examen de l'abdomen : hépato-splénomégalie.

Aires ganglionnaires normales.

Réflexes ostéo-tendineux normaux.

Examen de Laboratoire :

- numération formule sanguine : = hématies : 2.200.000
  = leucocytes : 9.000
  = hémoglobine : 40 %
  = valeur globulaire : 0,82
- urée : 0,55 g./$_{oo}$
- glycémie : 1,52 g./$_{oo}$

La malade reçoit une injection intramusculaire de 1000 microgrammes d'hydroxocobalamine par jour, pendant 10 jours.

Amélioration spectaculaire, reprise de l'appétit.

La malade sort guérie ; au 8ème jour, une formule sanguine montrait : = hématies : 4.500.000
= leucocytes : 6.800
= valeur globulaire : 0,96

L'hydroxocobalamine fait preuve d'une indiscutable action antalgique vis-à-vis des douleurs de nature neurologique plutôt qu'une action neurotrophique pure. Elle se comporte donc comme la cyanocobalamine . Toutefois, à égalité de posologie, l'hydroxocobalamine a une action plus rapide et parfois donne des résultats autrefois inaccessibles.

CONCLUSIONS

Au terme de cette étude sur l'hydroxocobalamine, nous pouvons conclure que ce corps, en tant que facteur vitaminique B_{12}, est identique à la cyanocobalamine, expliquant ainsi ses indications thérapeutiques similaires, mais, en fait, il s'agit d'une vitamine B_{12}-retard naturelle assurant :

- une rétention organique trois fois plus importante ;
- des taux sériques plus élevés et durables ;
- une fixation hépatique nettement plus marquée ;
- une excrétion plus lente.

Vitamine B_{12}-retard naturelle, l'hydroxocobalamine permet d'obtenir des résultats souvent majorés concernant l'intensité et la rapidité de ses effets et, d'autre part, permet d'espacer les injections : alors que, pour normaliser le métabolisme de la vitamine B_{12} chez l'homme, une dose de 500 microgrammes de cyanocobalamine doit être répétée tous les 14 jours, une dose identique d'hydroxocobalamine ne doit plus l'être que tous les 37 jours.

Cet intervalle devient plus net encore avec une dose double (1000 microgrammes), où la répétition des injections passe de 16 jours pour la cyanocobalamine, à 49 jours pour l'hydroxocobalamine, produit retard confirmé.

L'hydroxocobalamine semble supérieure à la cyanocobalamine et aux premières préparations retard, associant des véhicules étrangers car, si l'on retrouve , d'une part, une résorption plus lente au point d'injection, son mécanisme résulte, d'autre part, du caractère électro-positif de la molécule, qui opère vraisemblablement dans l'organisme une liaison non spécifique avec les protéines et, en particulier, les globulines α_1 et α_2 du sérum et des tissus.

Sur le plan clinique, l'hydroxocobalamine se révèle remarquable dans le traitement de l'anémie de Biermer, si nous nous reportons aux travaux de LICHTMANN et Coll. Ce produit retard peut se montrer efficace dans le traitement de certains syndrômes douloureux radiculaires. L'action antalgique de l'hydroxocobalamine a été bien mise en évidence par KLINGER et DALLE COSTE dans le traitement des polynévrites diabétiques.

Le Docteur SUREAU a bien voulu nous confier un certain nombre d'observations de malades, traités par l'hydroxocobalamine pour diverses raisons : asthénie, convalescence, syndrômes radiculaires, syndrômes anémiques. Nous avons retenu trois de ces observations, où l'action antalgique et hématologique de l'hydroxocobalamine nous paraît intéressante :

- une lombo-sciatique SI chez un homme , âgé de 76 ans et traité depuis de longues années pour une polyarthrite chronique évolutive ;

- une névralgie cervico-brachiale, secondaire à une arthrose cervicale ;

- une anémie hypochrome.

VU et PERMIS d'IMPRIMER :

Le RECTEUR de l'ACADEMIE
de PARIS :

J. R O C H E

Le DOYEN de la FACULTE
de MEDECINE de PARIS :

L. B I N E T

Le PRESIDENT de la THESE :

M. C O N T E

BIBLIOGRAPHIE

WOLFF René

Exposés annuels de biochimie médicale - Données récentes sur la vitamine B_{12}

CHEYMOL J.

Annales pharmaceutiques françaises 1956.

PATTE

Annales pharmaceutiques 1953 - Dosage sélectif de la vitamine B_{12} par chromatographie ascendante.

SKEGGS R., HANUS, MAC CAULEY, RIZZO

Hydroxocobalamin Physiological retention in the dog.

HEINRICH und GABBE

Intravitale retention und exkretion des Aquocobamids, einer für die Therapie geeigneten natürlichen Vitamin B_{12} Depot form.

LICHTMANN H., WATSON J., GINSBERG, PIERCE.

Vitamine B_{12b} - some properties and its therapeutic use.

GLASS (G.B.) R. SKEGGS

Applicability of hydroxocobalamin as a long acting Vitamin B_{12}

MILHAUD G.

Intestinal absorption of vitamin B_{12} and of a vitamin B_{12} peptide complexe in normal subjects and in patients with partial gastrectomy.

KLINGER R., DALLE COSTE P.

Prospective terapeutiche dell'drossicobalamina in varie forme neurologiche di soggetti diabetici - Il Polidinico.

KILLANDER, SCHILLING
Hydroxocobalamin - excretion and retention of massive doses in control subjects.
Clin. Med. April 1961.

MILHAUD G.
Mécanisme de l'effet retard de l'hydroxocobalamine (à paraître dans la revue française d'études cliniques et biologiques).

BOIVIN P.
Indications et limites de l'emploi de la vitamine B_{12} en thérapeutique (à l'exception des affections neurologiques) - Revue du Praticien n° 31, Déc.1961.

DAVIS R.L., O'CONNOR et Coll.
Metabolic studies of vitamine B_{12} complex - Proceedings of the society for experimental biology and medecine . Févr. 1959.

B. SUREAU, J. BERROD, L. MARTIN, C. FOISIL
L'hydroxocobalamine, vitamine B_{12} retard de choix (à paraître).

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION ... 1

PREMIERE PARTIE - VITAMINE B_{12} ou CYANOCOBALAMINE

1.- Historique - découverte ... 3

2.- Sources - Préparation ... 3

3.- Titrage : ... 4
. microbiologique = lactobacilli
= E. Coli
= Euglena Gracilis
. biologique
. physique
. chimique

4.- Chimie ... 8

5.- Physiologie ... 9

A.- Rôle de la B_{12} dans l'organisme : ... 9
. facteur de croissance
. synthèse des groupes méthyl labiles (méthionine-choline)
. métabolisme = protidique
= lipidique
= glucidique

B.- Absorption intestinale. ... 12

DEUXIEME PARTIE - COMPLEXE B 12 TANNATE DE ZINC - B 12 RETARD PAR VEHICULE RETARD ASSOCIE ... 14

- Principe

- Résultats : . taux sanguin
. élimination urinaire.

Pages

TROISIEME PARTIE - VITAMINE B 12 B ou HYDROXOCOBALAMINE 16

1.- Caractères physico-chimiques 16

2.- Méthodes d'investigation 17

3.- Pharmacologie 18

a.- Toxicité = aiguë
= semi-chronique

b.- expérimentation animale chez le chien 20

QUATRIEME PARTIE - EFFET RETARD DE L'HYDROXOCOBALAMINE 22

1.- Concentration sanguine 22

2.- Excrétion urinaire 23

3.- Fixation hépatique 25

4.- Absorption du lieu d'injection 26

5.- Absorption intestinale 26

6.- Bilan de l'hydroxocobalamine : comparaison au point de vue posologie de la B_{12} et de la B_{12} b 27

7.- Mécanisme d'actionretard 28

CINQUIEME PARTIE - INTERET CLINIQUE DE L'HYDROXOCOBALAMINE.

1.- Tolérance 30

2.- Action hématologique 31

3.- Action sur les neuropathies diabétiques ; observations 33

4.- Observations personnelles 37

CONCLUSION 40

BIBLIOGRAPHIE 42